

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08238

研究課題名(和文) 糖尿病性腎臓病における2つのフルクトース代謝酵素の役割の解明とその治療応用

研究課題名(英文) The roles of two isoforms of fructokinase on diabetic kidney disease

研究代表者

石本 卓嗣 (ISHIMOTO, TAKUJI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00534835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：野生型・KHK-A KO・KHK-A/C KOマウスを用いた糖尿病モデルの検討にて、野生型・KHK-A KOマウスは腎機能障害、尿NGALの上昇、解糖系代謝物・TCA回路代謝物の上昇を認め、KHK-Aマウスにおいて腎NADの低下を伴ってより顕著であった。これらの結果から、KHK-AはDKDの進展において腎保護的な働きがあることが示された。一方で、KHK-Cによるフルクトース代謝はDKDを増悪する可能性が示唆された。また本研究では、新たにKHK-C KOマウスを樹立した。また、KHK-Cを標的とした新規治療開発のため、KHK-Cを選択的に阻害するアンチセンスオリゴの作成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において検討を行った糖尿病性腎臓病(DKD)は現在も腎不全の原疾患の第一位であり、その治療法の確立が切望されている。また、先進国のみならず発展途上国も含めて世界中で増加しているメタボリック症候群および糖尿病の誘因の一つとして、砂糖・果糖ブドウ糖液糖に含まれるフルクトースの過量摂取が世界中で注目されている。本研究において分子標的としてのフルクトース代謝酵素KHKの有用性について、2種のアイソフォーム別に検討することは、DKDのおよびメタボリック症候群に対する有効性・選択性の高い治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diabetic KHK-A KO mice developed severe renal injury compared to diabetic wild-type mice, and this was associated with further increases of intrarenal fructose, DHAP, TCA cycle intermediate levels, and severe inflammation. In contrast, those were prevented in diabetic KHK-A/C KO mice. Further, diabetic KHK-A KO mice demonstrated decreased renal NAD+ level. These results suggest that KHK-C might play a deleterious role in DKD progression through endogenous fructose metabolism, and that KHK-A plays a unique protective role against the development of DKD. In addition, in this study, KHK-C knockout mice were newly developed using CRISPR/cas9 system. Furthermore, to develop the molecular therapy targeting KHK-C, KHK-C specific antisense oligonucleotide was made.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：フルクトース代謝 KHK-C KOマウス 糖尿病性腎臓病 アンチセンスオリゴ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は腎不全の原疾患の第一位であるが、近年、糖尿病において顕著な蛋白尿の増加のない症例が増加しており、糖尿病性腎臓病 (diabetic kidney disease, DKD) という概念が提唱されている。これらの腎組織では尿細管間質の炎症・線維化、細動脈硬化など、主に糸球体外での病変が認められるが、DKD における尿細管障害の機序は解明されていない。我々はこれまでに、フルクトース代謝が肥満・メタボリック症候群・脂肪肝・加齢による腎障害を誘導することを報告した (*PNAS* 2012, *Nature Commun* 2013, *Hepatology* 2013, *PNAS* 2018, *Nature Commun* 2018)。更に、糖尿病の高血糖下ではポリオール経路の活性化によりグルコースから内因性にフルクトースが産生・代謝され、炎症・酸化ストレス・尿酸産生を誘導することにより DKD を増悪させることを報告した。

フルクトースは主にケトヘキソキナーゼ (KHK) によるリン酸化にて代謝される。その過程で ATP を消費し、最終的に尿酸を産生する。KHK には KHK-C と KHK-A のアイソフォームがある。我々はこれまでに、ストレプトゾトシン (STZ) 誘導性糖尿病モデルにおいて、KHK 完全欠損マウス (KHK-A/C KO) では DKD が抑制されることを報告した (*JASN* 2014)。一方で、KHK-A 単独欠損マウス (KHK-A KO) では野生型マウスに比して DKD が増悪する (尿細管障害・腎機能障害)、との相反する予備検討結果を得ている。近年、KHK-A のプロテインキナーゼとしての新たな機能 (ホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) 合成酵素・PRPS1 のリン酸化) が報告された (*Nat Cell Biol.* 2016)。PRPP はペントースリン酸経路の代謝物であり、また NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) 産生に必須の物質であるが、KHK-A の NAD 代謝および腎疾患における役割は解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では現在までの知見を更に進め、「糖尿病性腎臓病における 2 つのフルクトース代謝酵素の役割の解明とその治療への応用」を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) DKD の進展における KHK-A の役割の検討

野生型・KHK-A KO・KHK-A/C KO マウスに対してストレプトゾトシン (STZ) の低用量連日法 (50 mg/kg、5 日間) を用いた I 型糖尿病モデルを作成し、腎機能、尿細管障害マーカー、腎病理、腎における炎症・酸化ストレス・ミトコンドリア障害についての解析およびメタボローム解析を行った。

### (2) KHK-C 欠損マウスの樹立

既に KHK-A KO・KHK-A/C KO マウスは保有しており、KHK-C KO マウスを作成した。KHK-C に特異的である exon3c を標的とした 1 本の gRNA および 2 本の gRNA を用いて、CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス KHK-C を欠損する遺伝子改変マウスを作成し、それぞれの Offsprings を用いて 10 ヶ所の off target 領域についての遺伝子配列の解析を行った。

### (3) マウス KHK-C antisense oligo (ASO) の作成

KHK-A・KHK-C は exon3 の splicing variant であり、それぞれ exon3a・exon3c を有する。KHK-C を特異的に抑制するため、exon3c を標的としたマウス KHK-C antisense の候

補配列を構造解析も行いつつ複数決定した。マウス KHK-C antisense の KHK-C 発現抑制効果の確認のため、マウス KHK-C を強制発現する HK-2 細胞株を樹立し、作成した KHK-C ASO の発現抑制効果を検討した

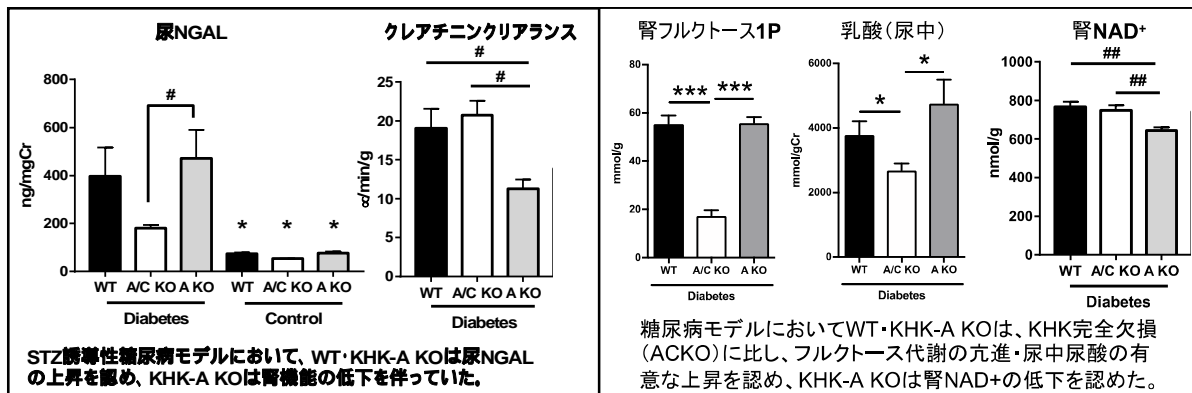
#### 4. 研究成果

##### (1) DKD の進展における KHK-A の役割の検討

KHK 完全欠損マウス(KHK-A/C KO)では、野生型マウス (WT) に比して DKD が抑制される一方で、KHK-A 単独欠損マウス(KHK-A KO) では野生型マウスに比して DKD が増悪する(尿細管障害・腎機能障害)、との結果を得た(図1)。KHK A/C KO マウスに比して、WT マウスおよび KHK-A マウスでは内因性に産生されたフルクトースの代謝の亢進(フルクトース 1 リン酸の上昇)を認め、尿中の乳酸の上昇・TCA 回路代謝物の上昇を認めた(図2)。また、腎組織内の NAD<sup>+</sup>量は上記の糖尿病 KHK-A KO にて低下しており、KHK-A による腎保護作用に NAD 代謝が関与する可能性が示唆された(図2)。これらの結果より、KHK-A は DKD の進展において腎保護的な働きがあることが示された。一方で、KHK-C によるフルクトース代謝は DKD を増悪する可能性が示唆された(Metabolism 2018)。

図 1

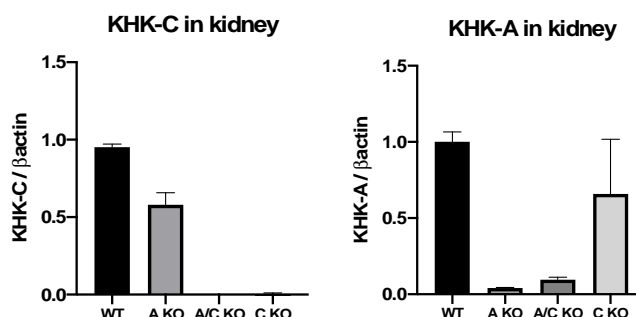
図 2



##### (2) KHK-C 欠損マウスの樹立

KHK-C に特異的である KHK-C mRNA の exon3c を標的とした 1 本の gRNA および 2 本の gRNA を用いて CRISPR/Cas9 システムにて作出されたマウスについて、標的領域における塩基配列の欠損を確認し、それぞれ複数の line を取得できた。また、10ヶ所の off target 領域についての遺伝子配列の解析を行い、当該領域の塩基配列に影響のないことを確認した。コロニーの拡大を行いつつ、平常状態での KHK-C、KHK-A の発現の確認を qPCR にて行い(図3)、KHK-C の選択的なノックダウンを確認した。現在、フルクトース多量摂取によるメタボリック症候群モデルおよび streptozotocin 誘導性糖尿病モデルマウスを作成し、経過観察中である。

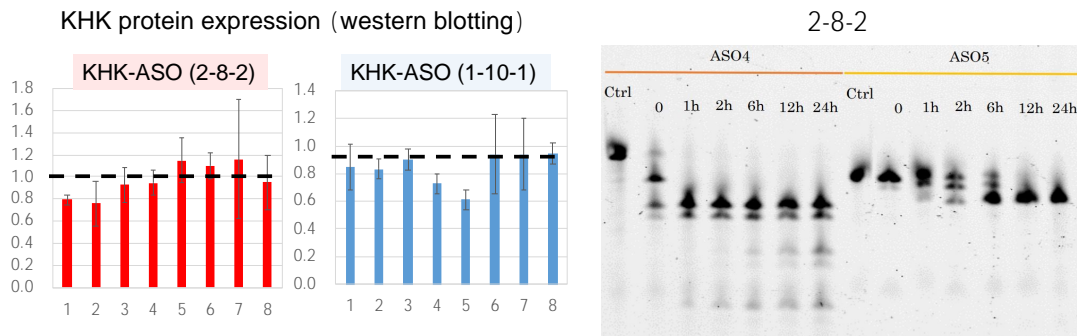
図 3



### (3) マウス KHK-C antisense oligo (ASO) の作成

マウス KHK-C mRNA の exon3 を標的として 8 種類の ASO を設計し、それぞれに 2 種類の Gapmer 型 ASO ( 2-8-2、 1-10-1 ) を合成し、マウス KHK-C を強制発現する HK-2 細胞株にて KHK-C の発現抑制効果を検討した。KHK の高度な発現抑制効果は認められず ( 図 4 ) マウスの生体内での KHK-C の発現抑制効果および病態モデルに対する治療効果を得るには不十分と考えられた。また、KHK-C の配列特異的な抑制効果は得られなかった。また、RNase H による切断の解析および 1 本鎖構造の取りやすさの検討からは、合成した 16 種類の ASO を用いた KHK-C を特異的な抑制は困難と考えられた ( 図 4 )。また HK-2 細胞における ASO の有効性が比較的弱い結果が得られたことから、細胞腫を変更し、また siRNA を用いる検討を開始している。

図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiro Hayasaki, Takuji Ishimoto, Tomohito Doke, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, Kazuhiro Furuhashi, Noritoshi Kato, Tomoki Kosugi, Naotake Tsuboi, Miguel A Lanaspas, Richard J Johnson, Shoichi Maruyama, Kenji Kadomatsu	4. 巻 71
2. 論文標題 Fructose Increases the Activity of Sodium Hydrogen Exchanger in Renal Proximal Tubules that is Dependent on Ketohexokinase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Biochem	6. 最初と最後の頁 54-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2019.05.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomohito Doke, Takuji Ishimoto, Takahiro Hayasaki, Satsuki Ikeda, Masako Hasebe, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, Noritoshi Kato, Tomoki Kosugi, Naotake Tsuboi, Miguel A. Lanaspas, Richard J. Johnson, Kenji Kadomatsu, and Shoichi Maruyama	4. 巻 85
2. 論文標題 Lacking Ketohexokinase-A Exacerbates Renal Injury in Streptozotocin-induced Diabetic Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 161-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2018.03.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 T. Doke, T. Ishimoto, T. Hayasaki, T. Tsuboi, R. Johnson, S. Maruyama.
2. 発表標題 LACKING FRUCTOKINASE PREVENTS RENAL LIPID ACCUMULATION IN HIGH-FAT DIET-FED STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC MICE
3. 学会等名 World Congress of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ishimoto, T. Hayasaki, T. Doke, M. Mori-Kawabe, S. Maruyama.
2. 発表標題 THE ROLES OF KETOHEXOKINASE IN RENAL SODIUM REABSORPTION AND ENDOTHELIAL FUNCTION IN MICE
3. 学会等名 World Congress of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohito Doke, Takuji Ishimoto, Takahiro Hayasaki, Richard J Johnson, and Shoichi Maruyama
2. 発表標題 Renal phospholipid accumulation in high-fat diet fed streptozotocin induced diabetic mice depends on ketohexokinase
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney week (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiki Tsuboi, Takuji Ishimoto, Kentaro Imai, Tomohito Doke, Noritoshi Kato, Yukiko Kamiya, Hiroyuki Asanuma, Shoichi Maruyama
2. 発表標題 The usefulness of antisense oligonucleotide modified with serinol nucleic acid for kidney disease.
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney week (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayumi Mori-Kawabe, Tomohito Doke, Takahiro Hayasaki, Takuji Ishimoto, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, Shoichi Maruyama
2. 発表標題 Role of ketohexokinase in the endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta from diabetic model mouse
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸山 彰一  (Maruyama Shoichi)  (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	コロラド大学腎臓病高血圧部門			